

УДК 581.1

ЭТИЛЕН-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИТНЫХ ПРОФИЛЕЙ ПРОРОСТКОВ *Arabidopsis thaliana* ПРИ ГРАВИТРОПИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

© 2017 г. Г. А. Пожванов^а, Н. С. Клименко^{а,б}, Т. Е. Билова^а, А. Л. Шаварда^с, С. С. Медведев^{а,1}

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

^бВсероссийский институт генетических ресурсов имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург

^сБотанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 01.02.2016 г.

Изучали изменение метаболитных профилей проростков *Arabidopsis thaliana* при переориентации растений относительно вектора силы тяжести (гравитимуляции) и влияние на этот процесс ингибиторов синтеза этилена. Анализ метаболитных профилей арабидопсиса проводили методом главных компонент. Показано, что гравитимуляция уже через 60 мин. инициирует существенные биохимические перестройки, которые были наиболее выраженными в 2-мм кончиках корней, включающих корневую чехлик, меристему и зону растяжения. В условиях гравитимуляции в кончиках корней возрастало содержание валина, лейцина, серина, γ -аминомасляной кислоты, никотиновой кислоты и снижалось содержание некоторых моносахаридов, а также малата и оксалата. Обработка ингибитором синтеза этилена аминоэтоксивинилглицином (10^{-5} М) нивелировала эффект гравитимуляции на метаболом кончиков корней. Выявленные перестройки метаболома указывают на участие фитогормона этилена в перестройках метаболома арабидопсиса в ходе гравитропической реакции.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* – гравитропизм – этилен – метаболомика – аминоэтоксивинилглицин – салициловая кислота

DOI: 10.7868/S0015330317050098

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее важным поляризованным внешним фактором для растительных организмов является гравитация, поскольку направление и величина гравитационного стимула в каждой конкретной точке пространства практически не изменяется в течение всего онто- и филогенеза растений. Поэтому естественно, что растительные организмы сформировали тонкие механизмы, благодаря которым они могут контролировать и корректировать положение своего тела относительно вектора силы тяжести, создавая новые оси полярности [1].

В нормальных условиях побеги направлены вверх (отрицательный гравитропизм), а корни устремлены вниз (положительный гравитропизм). В корнях рецепция силы тяжести локали-

зована в статочитах – клетках колумеллы центральной части чехлика, которые содержат амилопласты, обладающие высокой плотностью и выполняющие функцию статолитов [2]. Трансдукция гравитационного сигнала приводит к асимметричному росту ответу. Он реализуется благодаря изменениям в экспрессии генов, активности протеома, приводящих к изменению уровней низкомолекулярных метаболитов. Поэтому наряду с данными транскриптомики и протеомики, метаболомика может охарактеризовать всю совокупность низкомолекулярных соединений в растении и дать функциональную характеристику ответа на изменение положения в поле силы тяжести. Однако реальное применение метаболомного подхода в изучении гравитропизма задержалось из-за методических ограничений [3].

Так, низкомолекулярные соединения могут быть вовлечены в гравитропические реакции уже на этапе рецепции и трансдукции сигнала. Фосфолипиды и продукты работы фосфолипаз [4] участвуют в высвобождении ионов кальция из внутриклеточных депо и в регуляции клатрин-зависимого эндоцитоза. Спустя несколько минут после отклонения растения от вектора силы тяжести PIN3 переносчики (PIN-FORMED 3, инте-

Сокращения: АВГ – аминоэтоксивинилглицин; АЦК – 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота; МГК – метод главных компонент; ГХ-МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия; ГК – главная компонента; СК – салициловая кислота.

¹ *Адрес для корреспонденции:* Медведев Сергей Семенович. Кафедра физиологии и биохимии растений, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет. Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург 199034. Факс: +7 812 328-97-03. Электронная почта: s.medvedev@spbu.ru

гральный белок мембраны – транспортер ауксина) оказываются сосредоточенными на нижней части плазматических мембран клеток колумеллы [5], и поток ауксина перенаправляется вдоль новой оси полярности. В ходе развития ростового ответа можно ожидать изменение уровня метаболитов, имеющих отношение к сигналингу и регуляции осмотического давления, что опосредует дифференциальный рост и формирование гравитропического изгиба. Работы, в которых были измерены уровни отдельных метаболитов, в первую очередь фитогормонов и конъюгатов ИУК, уже были проведены [6]. Однако первым и пока единственным исследованием, в котором метаболомный подход был применен для изучения целого комплекса соединений первичного метаболизма в ходе гравитропической реакции растений, является работа Millar и Kiss [7]. В этой работе изучали изменение метаболитных профилей целых проростков арабидопсиса после 24 ч гравистимуляции и обнаружили, что после переориентации растений в пространстве уровни глюкозы и фруктозы возрастали, а содержание сахарозы снижалось, кроме того, были отмечены изменения уровней ряда аминокислот и жирных кислот.

Помимо ауксина, в гравитропическую реакцию вовлечены цитоскелет, ионы Ca^{2+} , H^+ и K^+ , Rho ГТФазы (мономерные регуляторные ГТФ-связывающие белки), а также другие фитогормоны [1, 4, 8]. Известно, что фитогормон этилен замедляет растяжение клеток и, таким образом, может влиять на гравитропическую реакцию растений [9]. Д.Н. Нелюбов в 1901 г. впервые показал, что т.н. “тройной ответ” у растений – изменение ориентации роста стебля (с вертикальной на горизонтальную), торможение роста стебля в длину и его утолщение – вызывается обработкой этиленом [10]. С тех пор прошло уже 115 лет, но роль этилена в формировании гравитропического изгиба до сих пор не понятна.

Метаболомный анализ зарекомендовал себя как эффективный методологический подход, позволяющий выявлять биохимические изменения, происходящие в растительном организме в ответ на действие внешних и внутренних факторов [11, 12]. Поэтому в настоящей работе мы применили метаболомный анализ для изучения метаболитных перестроек, которые могут возникать в ходе гравитропической реакции растений арабидопсиса, и исследования роли этилена в этом процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия выращивания. Объектом исследования служили 7-суточные

проростки растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, экотип Columbia 0. Растения выращивали в стерильных условиях на твердой минеральной питательной среде, разбавленной вдвое (МС/2, M0222, “Duchefa”, Нидерланды) и содержащей 1% (масс./об.) сахарозы (“Химреактив”, Россия) и 0.35% (масс./об.) фитогеля (“Sigma-Aldrich”) в вертикально ориентированных чашках Петри 125 × 125 × 17 мм (“Greiner Bio-One”, Германия), три ряда по 12 проростков в каждом. Семена стратифицировали в темноте в течение 1 суток при +4°C, после чего перемещали в климатическую камеру MLR-351 (“Panasonic”, Япония) при 16-часовом фотопериоде (флуоресцентные лампы FL40SS-W/37, 5000 лк) и температуре +20°C.

Гравистимуляция и обработка растений. По пять проростков арабидопсиса помещали между предметным и покровным (24 × 50 мм) стеклами и погружали на 60 мин в 100 мкл 10^{-5} М раствора АВГ (L- α -[2-аминоэтоксивинил]глицин) или 100 мкл 10^{-5} М салициловой кислоты в буфере Tris/Mes (2 мМ / 4 мМ), pH 6.0. Контрольные растения помещали в такой же буфер. Стоковые растворы (5 мМ) АВГ и салициловой кислоты готовили в смеси вода/ДМСО (1:1) и хранили при –20°C (все реактивы: Sigma-Aldrich, США). Гравистимуляцию растений осуществляли путем поворота предметных стекол в вертикальной плоскости на 90° относительно вектора силы тяжести.

Пробоподготовка и анализ методом газовой хроматографии (ГХ-МС). Три предварительно взвешенных целых проростка или 25 отрезков кончиков корней (2 мм) помещали в стеклянные виалы для хроматографии, заливали 500 мкл (целые проростки) или 200 мкл (кончики корней) 100% метанола, раствор быстро доводили до кипения для инактивации ферментов, и затем выдерживали при +4° С в течение 7 суток для экстракции метаболитов [12]. Метанольные экстракты высушивали до состояния тонкой пленки в вакуумном ротационном испарителе Eppendorf Concentrator Plus (“Eppendorf”, Германия) в течение 1–2 ч. Затем метаболитные экстракты растворяли в 40 мкл (из целых проростков) либо 20 мкл (из кончиков корней) пиридина, содержащего 0.8096 мг/мл трикозана ($C_{23}H_{48}$) в качестве внутреннего стандарта. Триметилсилильные производные получали добавлением к раствору равного объема БСТФА/ТМС (бис-триметилсилилтрифторацетамид : триметилхлоросилан, 99 : 1, Supelco, Sigma-Aldrich, США) при нагревании до 100°C в течение 15 мин; 1 мкл реакционной смеси использовали для инъекции в газовый хроматограф. Анализ триметилсилильных производных проводили с помощью газового хроматографа Agilent 6850 GC,

Таблица 1. Процент дисперсии, объясненный главными компонентами 1, 2, 3 (ГК1, ГК2, ГК3 соответственно), при сравнении метаболитных профилей 7-суточных проростков *A. thaliana*, обработанных салицилатом или аминоэтоксивинилглицином (АВГ) 10^{-5} М (рис. 1, 2)

		ГК1, %	ГК2, %	ГК3, %
Целые проростки	Вертикальный рост/Гравистимуляция	76	18	5
	Вертикальный рост/Вертикальный рост + салицилат	84	11	4
	Вертикальный рост/Вертикальный рост + АВГ	95	4	1
	Гравистимуляция/Гравистимуляция + салицилат	57	21	13
	Гравистимуляция/Гравистимуляция + АВГ	80	12	8
	Вертикальный рост + салицилат/Гравистимуляция + салицилат	56	22	12
	Вертикальный рост + АВГ/Гравистимуляция + АВГ	86	10	3
2-мм кончик корня	Вертикальный рост/Гравистимуляция	87	12	1
	Вертикальный рост/Вертикальный рост + АВГ	85	13	2
	Гравистимуляция/Гравистимуляция + АВГ	95	4	0.5
	Вертикальный рост + АВГ/Гравистимуляция + АВГ	96	3	1

оснащенного автоматическим пробоотборником Agilent G4513A и квадрупольным масс-селективным детектором Agilent 5975B VL MSD, как описано ранее [12]. Аналиты были разделены с использованием неполярной капиллярной колонки DB-5HT (5% фенилметилсилоксан, длина 30 м, внутренний диаметр 250 мкм, толщина пленки 0.1 мкм, J&W Scientific, США). Деконволюцию масс-спектров и идентификацию метаболитов выполняли в программном обеспечении AMDIS 2.71 (<http://chemdata.nist.gov>) с использованием баз данных NIST/EPA/NIH 11 Mass Spectral Library (<http://www.nist.gov/srd>) и пользовательской библиотеки AMDIS, созданной на кафедре физиологии и биохимии растений СПбГУ [13]. Расчет индексов удерживания проводили также в AMDIS на основании данных по времени выхода нормальных алканов C_8 – C_{38} . Аннотирование пиков на хроматограммах и измерение относительного содержания аналитов выполняли в программе UniChrom 5.09.1034 (www.unichrom.com). Для оценки относительной концентрации метаболитов использовали площадь пика, аннотированного в UniChrom.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в 3–4-х кратных биологических повторностях. Обработку данных метаболитных профилей проводили методом главных компонент (МГК) с помощью пакета прикладных программ MATLAB R2014a (<http://www.mathworks.com>). В процессе применения МГК происходит уменьшение размерности данных, что позволяет

отобразить многомерные данные на 2–3-мерной поверхности и тем самым делает их доступными для восприятия. В итоге каждое наблюдение, содержащее информацию о проанализированных метаболитах, оказывается представленным в виде единственной точки в двумерном пространстве главных компонент. Матрицей данных для анализа служили концентрации метаболитов, предварительно приведенные к единичной дисперсии с помощью шкалирования по стандартным отклонениям. В табл. 1 приведен процент дисперсии, объясненный главными компонентами 1, 2 и 3 (ГК 1, ГК 2, ГК 3), на рис. 1 и 2 показано распределение совокупностей низкомолекулярных метаболитов на плоскости в координатах ГК 1 и ГК 2.

Кратность изменения уровня метаболитов (табл. 2, 3) вычисляли как логарифм по основанию 2 от отношения среднего содержания соответствующего метаболита в экспериментальной пробе к среднему содержанию этого метаболита в контрольной пробе. Полученные результаты показывают, во сколько раз содержание идентифицированных метаболитов изменялось под действием гравистимуляции в целых проростках (табл. 2А) или в кончиках корней (табл. 3А); обработки салицилатом (табл. 2Б, В) или АВГ (табл. 3Б, В).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы анализировали содержание низкомолекулярных метаболитов, экстрагированных из целых проростков *A. thaliana*.

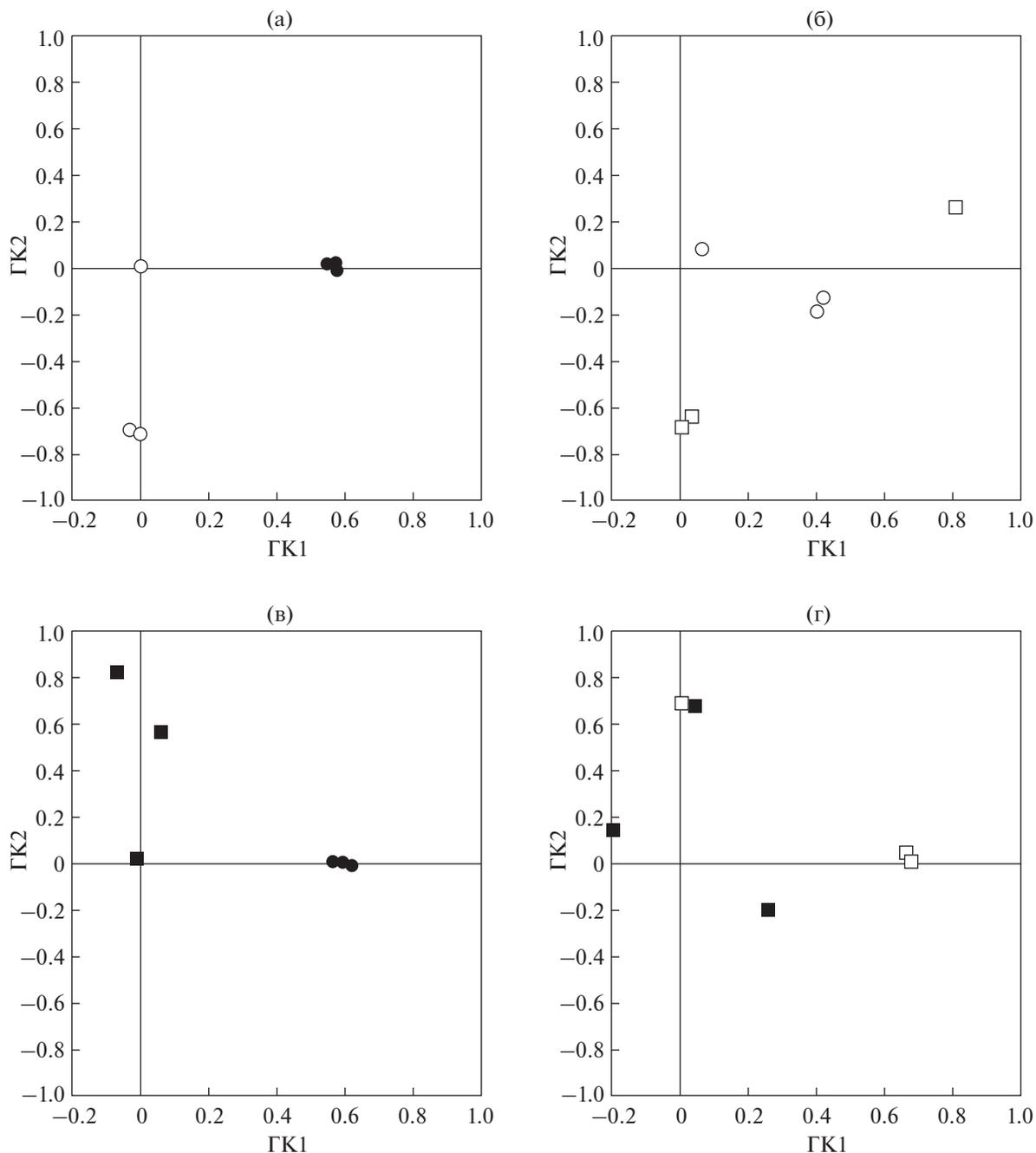


Рис. 1. Влияние салицилата 10^{-5} М на метаболитные профили вертикально растущих и гравистимулированных 7-дневных проростков *Arabidopsis thaliana*. На плоскости в координатах первой и второй главных компонент (ГК1 и ГК2) показано распределение экспериментальных точек, соответствующих метаболитному профилю в каждой повторности. Вертикально растущие и гравистимулированные путем поворота на 90° в вертикальной плоскости проростки *A. thaliana* находились в буфере Tris/Mes (2 мМ / 4 мМ, рН 6.0; контроль) либо в том же буфере + салицилат 10^{-5} М. (а) – сравнение метаболитных профилей контрольных вертикально растущих и гравистимулированных растений; (б) – влияние обработки салицилатом на метаболитные профили гравистимулированных проростков; (в) – влияние обработки салицилатом на метаболитные профили вертикально растущих проростков; (г) – сравнение метаболитных профилей вертикально растущих и гравистимулированных растений в условиях обработки салицилатом. Каждая модель построена на основании анализа концентраций 51 метаболита. Процент объясненной дисперсии приведен в таблице 1. ○ – вертикальный рост; ● – гравистимуляция; □ – вертикальный рост + салицилат; ■ – гравистимуляция + салицилат.

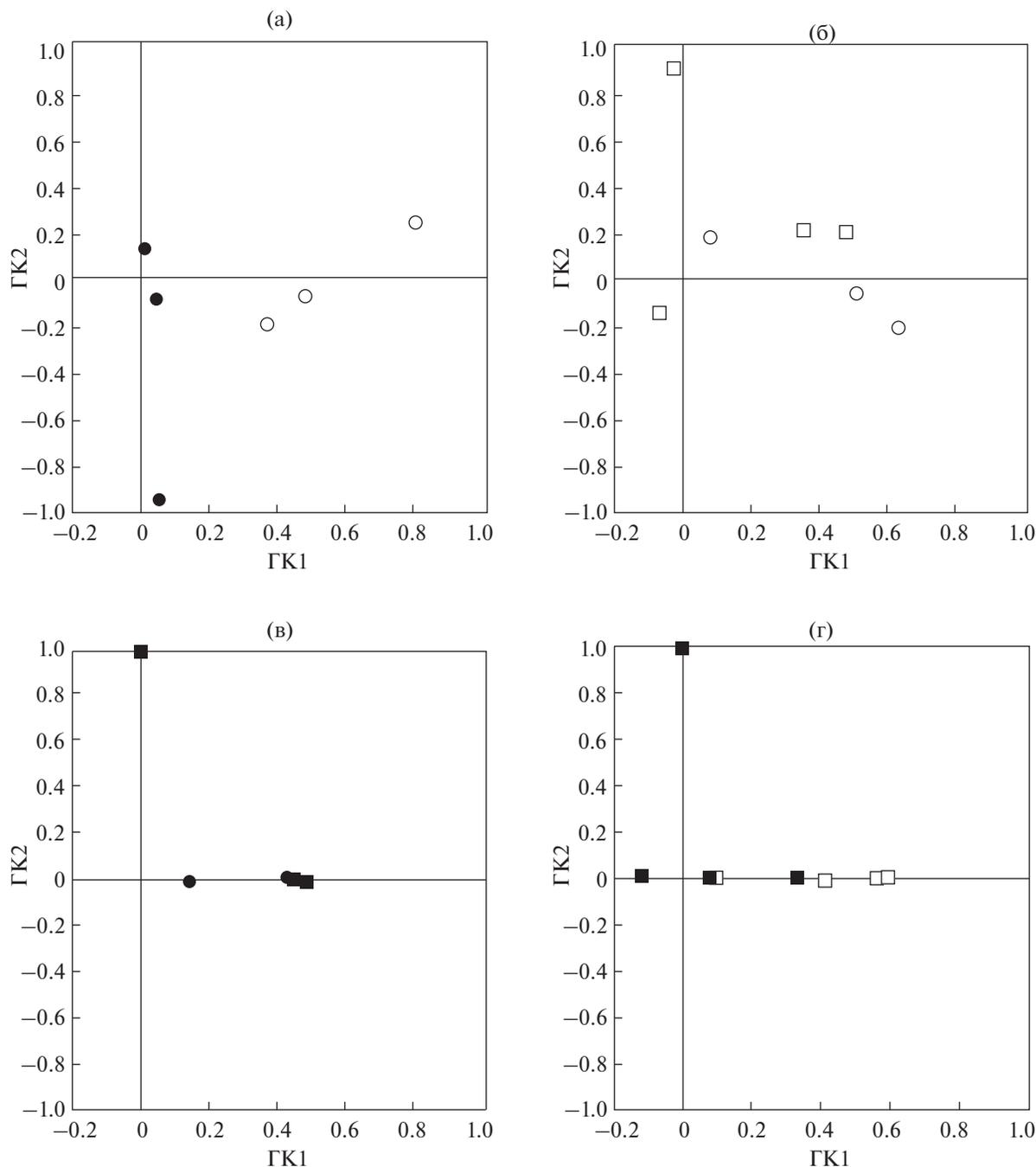


Рис. 2. Влияние аминоксидовинилглицина (АВГ) 10^{-5} М на метаболические профили вертикально растущих и гравистимулированных 7-дневным проростков *Arabidopsis thaliana*. На плоскости в координатах первой и второй главных компонент (ГК1 и GK2) показано распределение экспериментальных точек, соответствующих метаболическому профилю в каждой повторности. Вертикально растущие и гравистимулированные путем поворота на 90° в вертикальной плоскости проростки *A. thaliana* находились в буфере Tris/Mes (2 мМ/4 мМ, рН 6.0; контроль) либо в том же буфере + АВГ 10^{-5} М. (а) – сравнение метаболических профилей контрольных вертикально растущих и гравистимулированных растений; (б) – влияние обработки АВГ на метаболические профили вертикально растущих проростков; (в) – влияние обработки АВГ на метаболические профили гравистимулированных проростков; (г) – сравнение метаболических профилей вертикально растущих и гравистимулированных растений в условиях обработки АВГ. Каждая модель построена на основании анализа концентраций 23 метаболитов. Процент объясненной дисперсии приведен в таблице 1. ○ – вертикальный рост; ● – гравистимуляция; □ – вертикальный рост + АВГ; ■ – гравистимуляция + АВГ.

В каждой хроматограмме был аннотирован 51 компонент, из которых 36 было идентифицировано. Идентифицированные соединения включали аминокислоты, амиды, амины, органические кислоты, сахара, спирты, жирные кислоты, фенольные соединения, а также фосфорную кислоту и метилфосфат. Неидентифицированные 15 соединений различали по индексам удерживания.

Влияние гравистимуляции на метаболитные профили проростков арабидопсиса

На рис. 1 а хорошо видно, что гравистимуляция (поворот растений на 90° в вертикальной плоскости) приводила к разделению метаболитных профилей целых проростков вдоль оси ГК 1, что объясняло 76% дисперсии (табл. 1). Т.е. перориентация проростков арабидопсиса относительно вектора силы тяжести уже через 60 мин инициировала существенные биохимические перестройки, изменявшие их метаболитные профили. У гравистимулированных растений (табл. 2 А) возросло содержание маннозы, стахиозы, этаноламина, аланина и снизилась концентрация ряда жирных кислот (С18:0, С18:1, С16:0) и большинства аминокислот.

Влияние салицилата на биохимические изменения в проростках арабидопсиса

При изучении механизма действия этилена на ростовые процессы часто используют ингибиторы его синтеза — аминоксидовинилглицин (АВГ), аминоксидоксусную кислоту, ризобитоксин, а также эндогенное фенольное соединение — салициловую кислоту [14, 15]. На рис. 1б—г показано влияние салициловой кислоты на метаболитные профили вертикально ориентированных и гравистимулированных растений арабидопсиса. В вертикально ориентированных проростках в присутствии салицилата содержание большинства метаболитов снижалось (табл. 2Б). Происходило разделение совокупностей метаболитов вдоль оси ГК 1 (рис. 1б), которая объясняла 84% дисперсии (табл. 1). В условиях гравистимуляции под влиянием салициловой кислоты совокупности метаболитов также разделялись вдоль оси ГК 1 (рис. 1в). Возрастало содержание стеариновой и пальмитиновой кислот, уменьшался уровень валина, треонина, серина, аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, а также амидов глутамина и аспарагина (табл. 2В). Уровень объясненной дисперсии составлял 57% (табл. 1). Т.е. при гравистимуляции действие салицилата на метаболиты было выражено слабее. Обработка салицилатом вертикально растущих и гравистимулированных растений не

приводила к значимым различиям между метаболитными профилями (рис. 1 г).

Влияние аминоксидовинилглицина (АВГ) на биохимические изменения в проростках арабидопсиса

В качестве специфического ингибитора синтеза этилена используют аминоксидовинилглицин (АВГ), подавляющий реакцию образования предшественника этилена — 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК) — из S-аденозилметионина. Был проведен анализ низкомолекулярных метаболитов в целых проростках арабидопсиса, обработанных АВГ 10^{-5} М. В каждой хроматограмме было аннотировано около 30 компонентов, из которых 21 идентифицирован. Идентифицированные соединения включали аминокислоты, амиды, амины, органические кислоты, сахара, жирные кислоты (табл. 3). Разделение вдоль оси ГК 1, которая объясняла 95% дисперсии (табл. 1), совокупности метаболитов вертикально растущих и гравистимулированных проростков (рис. 2а) сохранялось и в условиях обработки АВГ, но было менее выраженным (рис. 2г, табл. 1). Однако на рис. 2б, в видно, что на уровне целых проростков обработка АВГ не влияла на метаболитный профиль специфическим образом как в условиях вертикального роста, так и при гравистимуляции. Под действием АВГ в целых проростках незначительно возрастал уровень аминокислот глицина, пролина, серина, снижался уровень молочной и γ -аминомасляной кислот (табл. 3). Мы предположили, что АВГ может локально влиять на метаболитизм этилена и, предположительно, метаболитный профиль тканей корня, — в зоне роста в кончике корня, где реализуется гравитропическая реакция.

Влияние гравистимуляции на метаболитные профили 2-мм кончиков корней проростков арабидопсиса

Хорошо известно, что в корнях процессы рецепции гравитационного стимула и развитие ростового ответа приурочены к небольшому участку, включающему корневую чехлик, меристему и зону растяжения [3, 7, 15]. Поэтому на следующем этапе анализировали влияние гравистимуляции на метаболитные профили только апикальной части корней проростков арабидопсиса. В каждой хроматограмме было аннотировано по 28 компонентов, из которых 25 было идентифицировано, включая аминокислоты, амиды, амины, органические кислоты, сахара, спирты, фосфорную кислоту (табл. 4).

Таблица 2. Кратность увеличения среднего уровня соединений, внесивших наибольший вклад в различия между метаболитными профилями гравистимулированных и вертикально растущих 7-дневных проростков *A. thaliana*, обработанных салицилатом 10^{-5} М. Отрицательные значения: уменьшение концентрации метаболита. Уровень значимости изменений показан звездочками: * $0.01 < p < 0.05$; ** $p < 0.01$. См. рис. 1а–в

Наименование соединения	А Гравистимуляция/ вертикальный рост	Б Вертикальный рост + + салицилат/ вертикальный рост	В Гравистимуляция + + салицилат/ гравистимуляция
<i>Аминокислоты</i>			
γ-Аминомасляная кислота	-0.58*	-2.08	-1.11*
α-Аланин	0.78**	-1.55	-0.37*
Аргинин	-0.41**	-1.87	0.98*
Аспарагиновая кислота	-1.31**	-1.34*	-1.67**
Валин	-0.38**	-1.14*	-0.95**
Глицин	-0.67**	-1.25*	-0.14**
Глутаминовая кислота	-0.66**	-1.57*	-2.87*
Лейцин	-0.22**	-0.56**	0.40*
Оксопролин	-2.95	-1.98	0.89**
Пролин	-0.67**	-0.34**	0.49**
Серин	0.24**	-0.68**	-1.40*
Треонин	-0.74**	-1.31*	-1.15**
<i>Амиды</i>			
Аспарагин	-1.15*	-0.66*	-2.35
Глутамин	0.11**	-0.78**	-3.13
Мочевина	1.39**	-1.48*	-0.48*
Орнитин	-0.87*	-1.04*	-0.38
<i>Амины</i>			
Этаноламин	1.11	-0.08**	-2.33
<i>Органические кислоты</i>			
Глицериновая кислота	0.70	-1.76	-0.56
Молочная кислота	-0.91**	-1.69*	0.36**
Треоновая кислота	-2.42*	-1.44*	0.11
Яблочная кислота	-0.26**	-0.36**	0.20**
Янтарная кислота	-2.67	-2.61	0.28**
<i>Сахара</i>			
Галактоза	-1.84**	-0.90*	0.60
Глюкоза	-0.99*	-1.02*	-0.07**
Манноза	1.11	-0.73**	2.03
Сорбоза	0.46**	-2.16	-0.51*
Стахиоза	1.26	-2.96	1.06
Фруктоза	-1.76*	-1.35*	-0.50**

Таблица 2. Окончание

Наименование соединения	А Гравистимуляция/ вертикальный рост	Б Вертикальный рост + + салицилат/ вертикальный рост	В Гравистимуляция + + салицилат/ гравистимуляция
<i>Спирты</i>			
Глицерол	-0.58**	-0.20**	1.79*
Инозитол	-1.33**	-1.23	-0.06**
<i>Жирные кислоты</i>			
Олеиновая кислота	-1.45*	-2.01	-1.29*
Линолевая кислота	0.62**	-2.01	0.06**
Пальмитиновая кислота	-0.71**	-0.06**	2.60
Стеариновая кислота	-7.21	-1.60**	6.16
<i>Неорганические кислоты</i>			
Фосфорная кислота	-0.95**	-1.19*	-0.21**
<i>Прочие соединения</i>			
метилфосфат	-0.46**	-0.16**	3.18
<i>Неидентифицированные соединения</i>			
RI = 1016.3	-0.71**	-1.26*	0.49*
RI = 1038.8	-0.03**	0.19**	1.89
RI = 1229	-0.87**	-1.03*	0.59*
RI = 1475	-1.90*	-2.22	-0.99*
RI = 1582	-0.58**	-0.10**	-0.22**
RI = 1731	-0.18**	-0.39**	2.39
RI = 1732.3	0.78	-0.24**	-0.68*
RI = 1801	-0.54**	-1.04*	0.01**
RI = 1975	-1.33	-4.36	-1.79*
RI = 2344.1	0.03**	0.85	-0.66**
RI = 2409.7	-0.95**	-0.90**	1.34**
RI = 2439	-2.76	-2.32	1.73
RI = 2979	0.27**	-2.53	-2.40*
RI = 986.2	-0.83**	-1.04*	0.97**
RI = 994.9	-0.59*	0.71**	0.54*

Гравистимуляция приводила к разделению метаболических профилей кончиков вертикально ориентированных и гравистимулированных растений вдоль оси ГК 1 (рис. 3 а). При этом происходило увеличение более чем в 1,5 раза содержания аминокислот (валина, лейцина, серина, γ -аминомас-

ляной кислоты), никотиновой кислоты и снижение содержания ряда гексоз, малата и оксалата (табл. 4 А). Следует отметить, что в кончике корня изменение метаболического профиля при гравистимуляции (рис. 3 а) было более выраженным (87% дисперсии (табл. 1)), чем в целых проростках

Таблица 3. Кратность увеличения среднего уровня соединений, вносивших наибольший вклад в различия между метаболитными профилями гравистимулированных и вертикально растущих 7-дневных проростков *A. thaliana*, обработанных аминоксидивинилглицином (АВГ) 10^{-5} М. Отрицательные значения: уменьшение концентрации метаболита. Уровень значимости изменений показан звездочками: * $0.01 < p < 0.05$; ** $p < 0.01$. См. рис. 2а–в

Наименование соединения	А Гравистимуляция/ вертикальный рост	Б Вертикальный рост + + АВГ/вертикальный рост	В Гравистимуляция + АВГ/гравистимуляция
<i>Аминокислоты</i>			
γ-Аминомасляная кислота	1.39*	-1.10*	-1.23*
Глутаминовая кислота	0.25**	0.59**	0.46**
Глицин	1.44*	1.10**	0.70**
Оксопролин	0.56**	0.36**	-0.18**
Пролин	1.10*	1.19*	0.62**
Серин	1.05*	2.02**	1.56*
<i>Амиды</i>			
Аспарагин	0.19*	0.91**	1.04**
Глутамин	0.27*	0.66**	1.14**
<i>Амины</i>			
Этаноламин	0.38*	1.53**	1.53**
<i>Органические кислоты</i>			
Бензоат	0	0.21*	0
Молочная кислота	-1.17	-1.16	0.46**
Эритроновая кислота	0.29**	0.22**	0.09**
<i>Сахара</i>			
Глюкоза	-0.23**	0.22**	0.28**
Манноза	-0.74**	0.36**	0.17**
Фруктоза	-1.04*	0.32*	0.33**
<i>Спирты</i>			
Глицерол	-0.11**	0.25**	-0.02**
Инозитол	0.11**	0.29**	0.19**
<i>Жирные кислоты</i>			
Олеиновая кислота	0.21**	0.10**	0.61*
Пальмитиновая кислота	0.29**	0.13**	4.03
Монозамещенный глицериновый эфир стеариновой кислоты	0.13**	0.10**	0.66**
Монозамещенный глицериновый эфир пальмитиновой кислоты	0.19**	0.12**	0.16**
<i>Неорганические кислоты</i>			
Фосфорная кислота	0.42**	0.03**	-0.15**
<i>Прочие соединения</i>			
Метилфосфат	0.01**	-0.82**	-0.33**

Таблица 4. Кратность увеличения среднего уровня соединений, вносящих наибольший вклад в различия между метаболитными профилями 2-мм апикальных отрезков корней гравистимулированных и вертикально растущих 7-дневных проростков *A. thaliana*, обработанных аминоксивинилглицином (АВГ) 10^{-5} М. Отрицательные значения: уменьшение концентрации метаболита. Уровень значимости изменений показан звездочками: * $0.01 < p < 0.05$; ** $p < 0.01$. См. рис. 3А, Б, В

Наименование соединения	А Гравистимуляция/ вертикальный рост	Б Вертикальный рост + АВГ/ вертикальный рост	В Гравистимуляция + АВГ/ гравистимуляция
<i>Аминокислоты</i>			
γ-Аминомасляная кислота	1.09**	1.58*	0.82**
α-Аланин	-0.33**	0.80**	0.39*
Валин	1.29*	0.59**	-0.71*
Глицин	-0.88**	0.58**	1.03*
Лейцин	1.07*	0.21**	0.21**
Оксопролин	0.22**	1.29**	1.01*
Серин	0.62*	1.16**	-0.35**
<i>Амиды</i>			
Глутамин	0.18**	0.81**	0.54*
Мочевина	-0.61**	1.32**	1.56*
<i>Амины</i>			
Этаноламин	-1.36*	0.18**	-0.56**
<i>Органические кислоты</i>			
Глицериновая кислота	-1.00**	0.97**	1.21*
Молочная кислота	-0.20**	0.96**	1.56*
Никотиновая кислота	0.78**	-0.26**	0.06*
Оксалат	-1.85*	0.39**	1.69*
Пировиноградная кислота	-0.01**	0.57**	0.43**
Яблочная кислота	-0.55**	0.84**	-0.16**
<i>Сахара</i>			
Арабиноза	-0.79**	0.43**	0.79*
Глюкоза	-1.07*	0.28**	0.91*
Манноза	-0.93**	0.38**	0.98*
Рамноза	1.44	3.10	1.50*
Фруктоза	-0.92**	0.45**	1.08*
<i>Спирты</i>			
Глицерол	-0.40**	1.06**	1.04**
Инозитол	-0.93*	0.38**	1.04**
<i>Жирные кислоты</i>			
Пальмитиновая кислота	-0.35**	0.55**	0.55**
<i>Неорганические кислоты</i>			
Фосфорная кислота	-0.42**	0.20**	-0.85**
<i>Неидентифицированные соединения</i>			
RI = 996.1	0.18**	0.64**	0.14**
RI = 1130.5	-0.50**	0.15**	0.66**
RI = 1801	0.05**	1.12**	1.38*

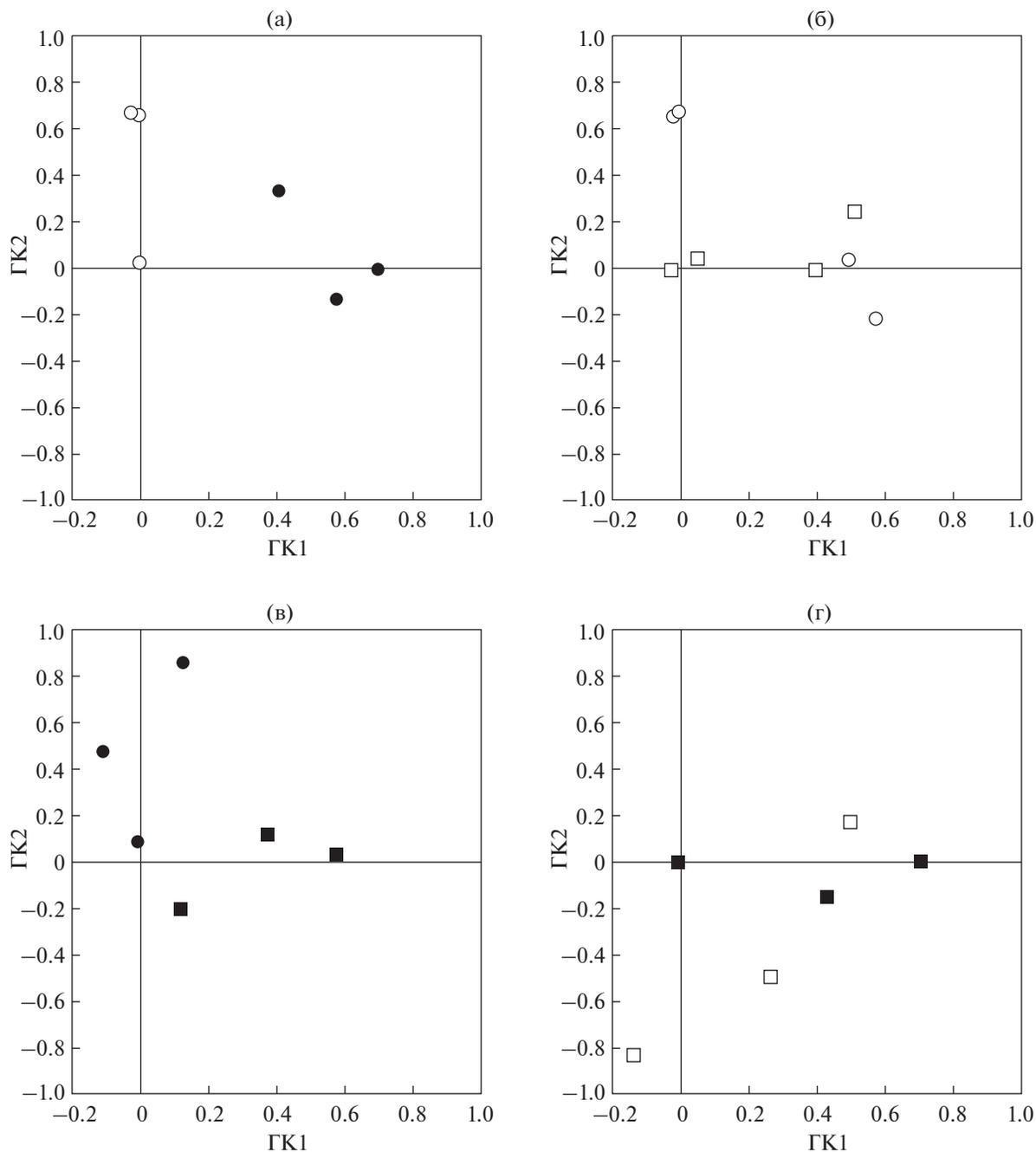


Рис. 3. Влияние аминоксислот глицина (АВГ) 10^{-5} М на метаболитные профили 2 мм отрезков корней вертикально растущих и гравистимулированных 7-дневных проростков *Arabidopsis thaliana*. На плоскости в координатах первой и второй главных компонент (ГК1 и ГК2) показано распределение экспериментальных точек, соответствующих метаболитному профилю в каждой повторности. Вертикально растущие и гравистимулированные путем поворота на 90° в вертикальной плоскости проростки *A. thaliana* находились в буфере Tris/Mes (2 мМ/4 мМ, pH 6.0; контроль) либо в том же буфере + АВГ 10^{-5} М. (а) – сравнение метаболитных профилей контрольных вертикально растущих и гравистимулированных 2 мм отрезков корней; (б) – влияние обработки АВГ на метаболитные профили 2 мм отрезков корней вертикально растущих растений; (в) – влияние обработки АВГ на метаболитные профили 2 мм отрезков корней гравистимулированных растений; (г) – сравнение метаболитных профилей 2 мм отрезков корней вертикально растущих и гравистимулированных растений в условиях обработки АВГ. Каждая модель построена на основании анализа концентраций 28 метаболитов. Процент объясненной дисперсии приведен в таблице 2. ○ – вертикальный рост; ● – гравистимуляция; □ – вертикальный рост + АВГ; ■ – гравистимуляция + АВГ.

арабидопсиса (в последнем случае ГК1 объясняла 76% дисперсии (табл. 1)).

Влияние аминоксидовинилглицина (АВГ) на биохимические изменения в апикальной части корней вертикальных и гравистимулированных проростков арабидопсиса

На рис. 3 показано влияние АВГ на метаболитные профили кончиков корней вертикально ориентированных и гравистимулированных корней арабидопсиса. Хорошо видно, что при обработке АВГ вертикально ориентированных растений разделение совокупностей метаболитных профилей в кончиках корней не происходило (рис. 3б). Положение точек относительно осей главных компонент при этом определялось индивидуальными различиями в рамках выборки.

Иную картину наблюдали в условиях гравистимуляции. Обработка АВГ приводила к разделению метаболитных профилей кончиков гравистимулированных корней вдоль оси ГК 1 с 95% объясненной дисперсии (рис. 3в). Под действием АВГ в кончиках корней возрастала концентрация ряда моносахаридов, снижалось содержание валина, фосфорной кислоты и этаноламина (табл. 4В). Обработка АВГ препятствовала разделению метаболитных профилей кончиков гравистимулированных корней. На рис. 3 г видно, что проекции точек, соответствующих вертикальному росту, на ось ГК1 находятся в той же области, что и проекции точек при гравистимуляции. Следовательно, разделение вдоль ГК1 в данном случае было связано главным образом с индивидуальными различиями между растениями.

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм(ы) гравитропической реакции растений изучают уже более 100 лет, и за это время накопился большой арсенал методических приемов, позволяющий эффективно анализировать процессы, происходящие в ходе гравитропизма [4, 8, 16–18]. В последнее время в гравитационной биологии растений все чаще стали привлекать возможности системной биологии, которая использует такие омиковые технологии, как транскриптомика [19], протеомика [20] и метаболомика [7].

Особенности метаболомики, отличающие ее от других “пост-геномных” технологий, заключаются в том, что анализ метаболома (в отличие от транскриптома и протеома) позволяет получить более адекватную функциональную характеристику организма. Метаболом (как фенотипическое проявление реализуемой генетической ин-

формации) отражает все изменения, которые происходят в организме в ответ на внутренние и внешние факторы. В основе метаболомики лежит анализ метаболитных профилей (metabolite profiling) или метаболитических “отпечатков пальцев” (metabolic fingerprinting) [11]. В нашей работе использовалось метаболитное профилирование проростков арабидопсиса при гравистимуляции.

В ходе гравитропической реакции выделяют четыре последовательных этапа: рецепцию гравитационного стимула, ранние события в трансдукции гравитационного сигнала, асимметричное перераспределение ауксина и ростовой ответ, приводящий к формированию гравитропического изгиба. В корнях все эти процессы, как уже упоминалось выше, локализованы в корневом чехлике, меристеме и зоне растяжения [3, 8, 16]. В работе Millar и Kiss [7], единственной доступной к настоящему времени, в которой метаболомный подход был применен к изучению гравитропизма арабидопсиса, изучали влияние гравистимуляции в течение 24 ч на метаболом целых проростков арабидопсиса. Однако известно, что изменения гормонального статуса и экспрессии ряда генов в ответ на гравистимуляцию происходят в более короткие промежутки времени [17, 18]. В наших опытах было показано, что гравистимуляция инициировала биохимические перестройки в растениях арабидопсиса после 60 мин воздействия (рис. 1а). В гравистимулированных проростках, в частности, возрастала концентрация таких сахаров, как манноза и стахиоза, но снижалось содержание некоторых жирных кислот (табл. 2А). На следующем этапе работы мы анализировали влияние гравистимуляции на метаболитные профили 2-мм кончиков корней, которые включали указанные выше зоны корня. Установлено, что после 60 мин гравистимуляции проростков *A. thaliana* в отрезках апикальных частей корней увеличивалось содержание сахаров, входящих в состав полимеров клеточной стенки – глюкозы, маннозы, арабинозы, а также фруктозы (рис. 3а). Millar и Kiss также выявили, что под воздействием гравистимуляции возрастает уровень глюкозы и фруктозы, но снижается содержание сахарозы [7]. Полученные результаты они объяснили возрастанием содержания ауксина, который стимулировал накопление инвертазы, расщепляющей сахарозу с образованием глюкозы и фруктозы. Анализируя целые проростки арабидопсиса, Millar и Kiss [7], выявили, что гравистимуляция инициирует сдвиг уровней аланина, аспарагина, глутамина, глицина и изолейцина, тогда как в нашей работе, выполненной на 2-мм отрезках корней, было показано, что гравистимуляция приводит к повышению содержания γ -аминомас-

ляной кислоты, серина, лейцина, валина. Таким образом, гравистимуляция уже через 60 мин инициирует изменения метаболитных профилей проростков арабидопсиса, что особенно было заметно в апикальной части корня. В наибольшей степени изменялся уровень моносахаридов и аминокислот. Интересно отметить, что в наших экспериментах, так же как и в работе Millar и Kiss [7], наблюдалось изменение содержания жирных кислот (стеариновой и пальмитиновой), что могло быть связано с сигнальной функцией этих соединений [21].

Как разновидность механического стресса [17], гравистимуляция стимулирует синтез этилена или его предшественника АЦК [22]. Установлено, что обработка АЦК арабидопсиса стимулирует развитие корневых волосков, утолщение главного корня, быстро и обратимо подавляет рост клеток корня растяжением [23]. Ингибирование роста является наиболее изученным эффектом этилена на клетки корня [9], благодаря которому он может способствовать усилению изгиба корня при отклонении растения от вектора силы тяжести [24]. Наиболее распространенным способом изучения влияния этилена на процессы жизнедеятельности растений является применение ингибиторов его синтеза. В работе Leslie и Romani, выполненной на культуре клеток груши *Pyrus communis*, было показано, что салицилат в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-4} М эффективно ингибирует синтез этилена [14]. Не исключено, что физиологические эффекты, индуцируемые салициловой кислотой, также могла проявлять бензойная кислота или ее производные [25]. Однако оказалось, что бензойная кислота и другие родственные фенольные кислоты неэффективны в качестве ингибиторов синтеза этилена. Ингибирование синтеза этилена было свойственно только салициловой кислоте и в небольшой степени ее ацетил-производному [14]. Ингибирующее действие салицилата было продемонстрировано также на плодах яблони *Malus domestica* [26]. Салицилат, по-видимому, ингибирует синтез этилена за счет непосредственного воздействия на АЦК-оксидазу [27]. На растениях маша *Vigna radiata* показано, что изменения экспрессии гена, кодирующего АЦК-оксидазу, в присутствии салицилата не происходит. Ингибирование синтеза этилена салицилатом, вероятно, происходит за счет обратимого взаимодействия салициловой кислоты с кофактором АЦК-оксидазы — ионом Fe^{2+} . Ранее нами было выявлено ингибирующее влияние салициловой кислоты на формирование гравитропического изгиба корней и coleoptилей у проростков кукурузы [15], что указывает на не-

обходимость этилена в тканях для нормального формирования гравитропического ответа.

Известно, что обработка салициловой кислотой в концентрации более 1 мМ негативно сказывается на прорастании семян, резко повышает продукцию пероксида водорода, снижает содержание хлорофилла и вызывает быстрое закрытие устьиц у арабидопсиса [28]. Опираясь на данные об ингибировании салицилатом синтеза этилена в концентрации 10^{-6} – 10^{-4} М [14] и подавлении гравитропической реакции в корневой системе салициловой кислотой в концентрации 10^{-5} М [15], в данной работе мы использовали салицилат в концентрации 10^{-5} М. На рис. 1б хорошо видно, что обработка салицилатом приводила к изменению метаболитных профилей вертикально ориентированных проростков арабидопсиса. Этот эффект мог быть связан как с подавлением синтеза этилена, так и с гормональной активностью самого салицилата.

При гравистимуляции под влиянием салициловой кислоты также происходило разделение совокупности метаболитов вдоль оси ГК1 (рис. 1в), что согласуется с полученными нами ранее результатами о влиянии салициловой кислоты на формирование гравитропического изгиба [15]. На рис. 1г можно видеть, что метаболитные профили гравистимулированных и вертикально ориентированных проростков в присутствии салицилата различались меньше, чем без ингибитора, что свидетельствовало о снижении эффекта гравистимуляции на метаболитные профили проростков под действием салициловой кислоты. С учетом имеющихся сведений о подавлении салицилатом синтеза этилена [14, 26] можно сделать вывод о том, что ингибирование синтеза этилена салициловой кислотой подавляло также и биохимические изменения, инициируемые гравистимуляцией.

Нам известна только одна работа, в которой прямо изучался вопрос влияния салициловой кислоты на процессы, проходящие при развитии гравитропической реакции [29]. В этой работе было показано, что обработка салициловой кислотой (СК) замедляла рост корней и формирование гравитропического изгиба. Ввиду этого обстоятельства, в дальнейших экспериментах использовали аиноэтоксивинилглицин (АВГ), который специфично подавляет синтез предшественника этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) из S-аденозилметионина ферментом АЦК-синтазой [13]. Мы анализировали влияние АВГ на состав метаболитов, экстрагированных из целых растений и 2-мм отрезков апикальной части корней вертикально ориентированных и гра-

вистимулированных проростков арабидопсиса (рис. 2, 3).

Обработка АВГ целых проростков показала (рис. 2а, г), что, в отличие от обработки салицилатом, подавлявшим разделение метаболитных профилей при гравистимуляции (рис. 1а, г), АВГ не оказывал значительного эффекта на метаболитный профиль в масштабе целого растения (рис. 2б, в). Мы предположили, что действие АВГ более специфично по сравнению с салицилатом и локализовано в кончике корня, где может реализоваться регуляторная функция этилена как стрессового гормона. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали метаболитные профили 2-мм кончиков корней арабидопсиса.

Обработка АВГ (рис. 3б) вертикально ориентированных растений не вызывала заметных изменений метаболитных профилей кончиков корней, в отличие от салицилата, который такие изменения инициировал (рис. 1б). При гравистимуляции АВГ вызывал разделение метаболитных профилей кончиков корней вдоль оси ГК1 (рис. 3в). Проекция точек, соответствующих гравистимуляции при обработке АВГ, на ось ГК1 находятся в той же области, что и проекция точек вертикально ориентированных растений (рис. 3г). Таким образом, воздействие ингибитора синтеза этилена – АВГ – снимало эффект гравистимуляции на метаболом кончиков корней проростков арабидопсиса. Вероятно, изменение метаболитного профиля вызвано ингибированием синтеза этилена и имеет отношение к скорости роста (и развития гравитропического изгиба), поскольку при обработке АВГ у растений арабидопсиса резко возрастает скорость роста корней как в вертикальном положении, так и при гравистимуляции [30].

Таким образом, под влиянием гравистимуляции в проростках *A. thaliana* уже через 60 мин возникали биохимические перестройки, изменявшие метаболитные профили растений. Эти изменения в 2-мм кончиках корней, включающих корневую чехлик, меристему и зону растяжения, были более значимыми по сравнению с изменениями в масштабе целого растения. Данный эффект снижался при обработке салицилатом и практически полностью нивелировался АВГ. Полученные результаты указывают на участие фитогормона этилена в перестройках метаболома арабидопсиса в ходе гравитропической реакции.

Работа выполнена за счет средств НИР СПбГУ 1.38.233.2014, 1.42.1282.2014 и гранта РФФИ № 17-04-00862 с привлечением инструментальной базы Ресурсного центра “Развитие клеточных и молекулярных технологий” СПбГУ (проекты 109-72, 109-244).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Медведев С.С.* Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 543–556.
2. *Morita M.T., Tasaka M.* Gravity sensing and signaling // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 712–718.
3. *Schüler O., Hemmersbach R., Böhmer M.* A Bird's-Eye View of Molecular Changes in Plant Gravitropism Using Omics Techniques // Frontiers in Plant Science. 2015. V. 6 P. 1176–1188.
4. *Kolesnikov Y.S., Kretynin S.V., Volotovskiy I.D., Kordyum E.L., Ruelland E., Kravets V.S.* Molecular mechanisms of gravity perception and signal transduction in plants // Protoplasma. 2016. V. 253. P. 987–1004 doi 10.1007/s00709-015-0859-5
5. *Ischebeck T., Werner S., Krishnamoorthy P., Lerche J., Meijón M., Stenzel I., Löffke C., Wiessner T., Im Y.J., Perera I.Y., Iven T., Feussner I., Busch W., Boss W.F., Teichmann T., Hause B., Persson S., Heilmann I.* Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in Arabidopsis // Plant Cell. 2013. V. 12. P. 4894–4911.
6. *Buer C.S., Sukumar P., Muday G.K.* Ethylene Modulates Flavonoid Accumulation and Gravitropic Responses in Roots of Arabidopsis // Plant Physiology. 2006. V. 140. P. 1384–1396.
7. *Millar K.D., Kiss J.Z.* Analyses of tropistic responses using metabolomics // Am. J. Bot. 2013. V. 100. P. 79–90.
8. *Blancaflor E.B.* Regulation of plant gravity sensing and signaling by the actin cytoskeleton // Am. J. Bot. 2013. V. 100. P. 143–152.
9. *Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., Van Der Straeten D., Beemster G.T., Sandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M.J.* Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation // Plant Cell. 2007. V.19. P. 2186–2196.
10. *Neljubov D.* Über die horizontale Nutation der Stengel von Pisum sativum und einiger anderen Pflanzen // Beih. Bot. Zentralb. 1901. V. 10. P. 128–139.
11. *Shulaev V.* Metabolomics technology and bioinformatics // Brief Bioinform. 2006. V.7. P. 128–139.
12. *Смоликова Г.Н., Шаварда А.Л., Алексейчук И.В., Чанцева В.В., Медведев С.С.* Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus L.* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19. С. 121–127.
13. *Shender V.O., Pavlyukov M.S., Ziganshin R.H., Arapidi G.P., Kovalchuk S.I., Anikanov N.A., Altukhov I.A., Alexeev D.G., Butenko I.O., Shavarda A.L., Khomyakova E.B., Evtushenko E., Ashrafyan L.A., Antonova I.B., Kuznetsov I.N., Gorbachev A.Y., Shakhparonov M.I., Govorun V.M.* Proteome–metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication // Molecular & Cellular Proteomics. 2014. V. 13. P. 3558–3571.
14. *Leslie C.A., Romani R.J.* Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid // Plant Physiol. 1988. V. 88. P. 833–837.

15. *Медведев С.С., Маркова И.В.* Участие салициловой кислоты в гравитропизме у растений // Доклады Академии Наук СССР. 1991. Т. 316. С. 4.
16. *Verbelen J.P., Cnodder T.D., Le J., Vissenberg K., Baluška F.* The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities // Plant Signaling & Behavior. 2006. V. 1:6. P. 296–304.
17. *Band L.R., Wells D.M., Larrieu A., Sun J., Middleton A.M., French A.P., Brunoud G., Sato E.M., Wilson M.H., Peret B., Oliva M., Swarup R., Sairanen I., Parry G., Ljung K., Beeckman T., Garibaldi J.M., Estelle M., Owen M.R., Vissenberg K., Hodgman T.C., Pridmore T.P., King J.R., Vernoux T., Bennett M.J.* Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 4668–4673.
18. *Sato E.M., Hijazi H., Bennett M.J., Vissenberg K., Swarup R.* New insights into root gravitropic signaling // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 2155–2165.
19. *Aubry-Hivet D., Nziengui H., Rapp K., Oliveira O., Paponov I. A., Li Y., Hauslage J., Vagt N., Braun M., Ditengou F.A., Dovzhenko A., Palme K.* Analysis of gene expression during parabolic flights reveals distinct early gravity responses in *Arabidopsis* roots // Plant Biology. 2014. V. 16. (Suppl. 1). P. 129–141.
20. *Schenck C.A., Nadella V., Clay S.L., Lindner J., Abrams Z., Wyatt S.E.* A proteomics approach identifies novel proteins involved in gravitropic signal transduction // American Journal of Botany. 2013. V. 100. P. 194–202.
21. *Andreeva Z., Barton D., Armour W.J., Li M.Y., Liao F., Mckellar H. L., Pethybridge K.A., Marc J.* Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots // Planta. 2010. V. 232. P. 1263–1279.
22. *Madlung A., Behringer F.J., Lomax T.L.* Ethylene plays multiple nonprimary roles in modulating the gravitropic response in tomato // Plant Physiol. 1999. V. 120. P. 897–906.
23. *Strader L.C., Chen G.L., Bartel B.* Ethylene directs auxin to control root cell expansion // Plant J. 2010. V. 64. P. 874–884.
24. *Chang S.C., Kim Y., Lee J. Y., Kaufman P. B., Kirakosyan A., Yun H. S., Kim T., Kim S. Y., Cho M. H., Lee J. S., Kim S.* Brassinolide interacts with auxin and ethylene in the root gravitropic response of maize (*Zea mays*) // Physiologia Plantarum. 2004. V. 121. P. 666–673.
25. *Watanabe K., Fujita T., Takimoto A.* Relationship between structure and flower-inducing activity of benzoic acid derivatives in *Lemna paucicostata* // Plant. Cell. Physiol. 1981. V. 22. P. 1469–1479.
26. *Fan X., Matteis J.P., Fellman J.K.* Inhibition of apple fruit 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity and respiration by acetylsalicylic acid // J. Plant. Physiol. 1996. V. 149. P. 469–471.
27. *Lee J.-H., Jin E.S., Kim W.T.* Inhibition of Auxin-Induced Ethylene Production by Salicylic Acid in Mung Bean Hypocotyls // Journal of Plant Biology. 1999. V. 42. P. 1–7.
28. *Rivas-San Vicente M., Plasencia J.* Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 3321–3338.
29. *Du Y., Tejos R., Beck M., Himschoot E., Li H., Robatzek S., Vanneste S., Friml J.* Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking // PNAS. 2013. V. 110. P. 7946–7951
30. *Пожванов Г.А., Гобова А.Е., Банкин М.П., Виссенберг К., Медведев С.С.* Влияние этилена на перестройки актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней арабидопсиса // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 624–635.